

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/23536 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/96, C12Q 1/37, C12N 9/74 (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06513
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 22 日 (22.09.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/272092 1999年9月27日 (27.09.1999) JP  
特願2000/212924 2000年7月13日 (13.07.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION) [JP/JP]; 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 奥田昌宏 (OKUDA, Masahiro) [JP/JP]; 菊川紀弘 (KIKUKAWA, Norihiro) [JP/JP]; 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研究開発センター内 Hyogo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MEANS OF STABILIZING THROMBIN AND COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: トロンビンの安定化手段および組成物

(57) Abstract: Means of stabilizing thrombin and compositions containing thrombin which has been stabilized and achieves a high assay reproducibility. Namely, a means of stabilizing thrombin characterized by adding an effective amount of one or more members selected from among calcium ion, surfactants and proteins; compositions containing the thus stabilized thrombin; another means of stabilizing thrombin wherein an effective amount of a water-soluble organic acid is further employed; compositions containing the thus stabilized thrombin; and thrombin-containing compositions showing an extremely high stability of thrombin and an extremely high assay reproducibility of a test substance with the use of a thrombin-containing reagent which comprise the above-described composition containing the stabilized thrombin and one or more members selected from among high-molecular weight polysaccharides and synthetic polymers.

[続葉有]

WO 01/23536 A1



---

(57) 要約:

トロンビンの安定化手段および安定化された測定再現性の良好なトロンビン含有組成物の提供。

カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選ばれる1または2以上をその有効量含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物、さらにこれらに加えて水溶性有機酸の有効量を併用するトロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物を提供する。また、上記安定化されたトロンビン含有組成物に高分子多糖類もしくは合成高分子類の1種または2種以上を含有させた、トロンビンの安定性とトロンビン含有した試薬を用いる被検物質の測定再現性が極めて高いトロンビン含有組成物を提供する。

## 明細書

## トロンビンの安定化手段および組成物

## 5 技術分野

本発明は、トロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物に関する。さらに詳しくは、臨床検査の分野において用いられるトロンビン試薬の安定化手段および安定化されたトロンビンを含有する試薬に関する。

## 10 背景技術

フィブリノゲンをフィブリンに変換する酵素であるトロンビンは血液凝固反応過程で非常に重要な役割をしている。臨床検査の分野においては、トロンビンを用いてフィブリノゲン濃度を測定したり、トロンビン阻害物質の活性、例えば、アンチトロンビン活性、ヒルジンの活性、さらに化学合成阻害剤の活性を測定するために多く用いられている。

しかしながら、一般にトロンビンは不安定であるため、長期間保存する場合には通常凍結乾燥処理を施して保存していた。

トロンビンを安定化させる試みは現在まで数多く行われてきた。例えば、特開昭56-39782号公報、特公平3-76292号公報、特開平1-93536号公報、特開平2-53732号公報、特開昭64-40433号公報、特開平7-33799号公報、特開平9-328436号公報、特公平8-13750号公報、特開平7-165604号公報、特公平7-64747号公報、特開昭63-192723号公報、特開平4-320683号公報、特公昭58-26956号公報、特開平10-52267号公報、特開昭60-1112721号公報、特開昭56-68607号公報にその例を見ることができる。

しかし、これらのいずれもトロンビンの安定化方法として完全なものではなく、とりわけ臨床検査診断薬に用いるには十分な安定性を示すには至っていない。

他方、測定試薬に用いられるトロンビン、一般にヒトまたは動物由来のトロンビンを適当な緩衝液や安定化剤の含まれた溶液中に目標とする力価となるように加えて調製され、溶液または凍結乾燥品として保存、使用される。調製されたトロンビン試薬は、前述の如く様々な目的に用いられるが、いずれの場合にも、

- 5 最終的にトロンビン自身の活性を測定することによりその目的を達成している。

トロンビンの活性の測定には、人工合成基質を用いた測定法と天然の基質であるフィブリノゲンを用いた測定法が一般的に用いられる。前者は比色分析が通常であり、後者は凝固時間分析が一般的である。後者の凝固時間分析法は、その検出手段として、散乱光や透過光の変化を検出することにより凝固時間を求める方法や、凝固形成により球の移動ができなくなることを検出することにより凝固時間を求める物理的方法等が知られている。

- 10 上記の検出方法による凝固時間測定の最大の課題は、測定の再現性が悪いことであつた。特にトロンビンを用いたフィブリノゲンのフィブリンへの変換反応は液相反応から固相へ移行する反応であり、反応条件すなわちpHやイオン強度等により大きく変動することが知られている。これら反応条件の影響によって再現性が悪くなっていた。そこで、液状で安定なトロンビンを用いた、反応条件の影響を受けない、再現性の良い測定系の構築が待ち望まれていた。

#### 発明の開示

- 20 本発明の目的は、トロンビンの安定化手段および安定化された測定再現性の良好なトロンビン含有組成物および当該組成物を用いた試薬を提供することにある。

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、トロンビンに、カルシウムイオンを、またはカルシウムイオンと水溶性の有機酸を混合して含ませることにより、溶液状態、凍結乾燥品、または凍結乾燥処理した後再溶解させた溶液いずれにおいても

25 トロンビンの失活を防止できることを見出した。さらに、カルシウムイオン、水溶性有機酸以外にも、界面活性剤やタンパク質等がトロンビンに対する安定化効果を示すことを見出した。また、安定化効果を示す上記物質の他に、高分子多糖

類または合成高分子類の1種または2種以上を混合して含有させることにより、測定再現性の良好なトロンビン試薬が調製できることを見出し、本発明を完成した。

- すなわち本発明は、(1) カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段、(2) カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする前記(1)のトロンビンの安定化手段、(3) 少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする前記(2)のトロンビンの安定化手段、(4) 少なくとも前記(1)から(3)のいずれか1のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物、(5) トロンビンを含む試薬を用いる被検物質の活性測定再現性確保のために、高分子多糖類および/または合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせる測定再現性機能を有する物質を、有効量含有することを特徴とする前記(4)に記載のトロンビン含有組成物、(6) 液状製剤であることを特徴とする請求の前記(4)または(5)に記載のトロンビン含有組成物、(7) 少なくとも前記(1)～(6)のいずれか1のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物の製造方法、および(8) 少なくとも前記(1)～(6)のいずれか1のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物を試薬として用いる測定方法、からなる。

発明を実施するための最良の形態

- 25 本発明のトロンビン安定化手段および該安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物について、さらに詳しく説明する。本発明のトロンビンの安定化手段は、カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以

- 上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする。また、これらの化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物をさらに併用するトロンビン安定化手段でありうる。ここで、安定化機能を有する化合物の安定化有効量とは、安定性を向上させる量であればよく、特に限定されないが、例えばトロンビンを含む溶液を25℃で6ヶ月保存した場合において、トロンビン溶液調製直後のトロンビン活性に対して少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、更に好ましくは70%以上の活性が保持される程度の安定化機能を有する化合物の量を意味する。ここで手段とは、目的を達成するために使用する方法および/または媒体を意味する。

(トロンビン)

- 本発明のトロンビン安定化手段で安定化されるトロンビンは、動物由来、ヒト血漿由来、または遺伝子工学的手法で調製されたもののいずれでもよい。また、該安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物の、溶液中のトロンビン濃度は、その活性が目的とする活性値に調整されていればよく、特に限定されない。

(カルシウムイオン)

- トロンビンの安定化手段として用いるカルシウムイオンとして、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、グルクロン酸カルシウム、酒石酸カルシウム等の水溶性のカルシウム化合物が例示される。これらカルシウム化合物は1種または2種以上を組み合わせ選択して使用することができる。

カルシウム化合物のトロンビンに対する安定化有効量は、安定性を向上させる量であればよく、特に限定されないが、例えばトロンビンの液状溶解時における化合物の終濃度が5 mM~100 mMであることが好適で、より好ましくは10 mM~50 mMである。

25 (有機酸)

トロンビンの安定化手段として用いる有機酸は、水溶性のものが用いられ、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、蔞酸、マロン酸、コハク酸、グルコン

酸、乳酸、グルクロン酸、グリコール酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、グルタル酸、アミノ酢酸、アミノカプロン酸等を例示することができる。これらの有機酸は、遊離酸またはその塩のどちらを用いても良い。また、1種もしくは2種以上を組み合わせ選択し使用することができる。

- 5 有機酸のトロンビンに対する安定化有効量は、安定性を向上させる量であれば良く、特に限定されないが、例えばトロンビンの液状溶解時における有機酸の終濃度が10 mM～500 mMであることが好適で、より好ましくは50 mM～200 mMである。

(界面活性剤)

- 10 トロンビンの安定化手段として用いる界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム等が、陽イオン性界面活性剤として、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルアンモニウムブロミド、ドデシ
- 15 ルピリジニウムクロリド等が、両イオン性界面活性剤として、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CHAPSO)、パルミトイルリゾレシチン、ドデシル-N-ベタイン、ドデシル-β-アラニン等が、非イオン性界面活性剤として、オクチルグルコシド、ペプチルチオグルコシド、デカノイル-N-メチルグルカミド、ポリ
- 20 オキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル(トライトンXシリーズ)、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル
- 25 (Tweenシリーズ)を例示することができる。

これら界面活性剤のうち非イオン性界面活性剤が特に好ましく用いられる。また、これら界面活性剤は1種もしくは2種類以上を組み合わせ選択し用いるこ

とができる。

界面活性剤のトロンビンに対する安定化有効量は、安定性を向上させる量であれば良く、特に限定されないが、例えばトロンビンの液状溶解時における界面活性剤の終濃度が0.001～1重量/容量%であることが好適で、より好ましく

- 5 は0.005～0.1重量/容量%で用いる。

(タンパク質)

- トロンビンの安定化手段として用いるタンパク質としては、アルブミン、ゼラチン、グロブリンを例示することができるが、トロンビンに対する生理学的または生化学的機能をもたないものは一般的に使用できる。これらタンパク質は1種
- 10 もしくは2種以上を組み合わせで選択し用いることができる。

タンパク質のトロンビンに対する安定化有効量は、安定性を向上させる量であれば良く、特に限定されないが、例えばトロンビンの液状溶解時におけるタンパク質の終濃度が0.05～10重量/容量%であることが好適で、より好ましくは0.1～5重量/容量%である。

- 15 上記、トロンビンの安定化手段に用いるカルシウムイオン、水溶性有機酸、界面活性剤、およびタンパク質は、トロンビンの溶液状態での保存時、乾燥状態での保存時、および乾燥もしくは凍結乾燥品を溶解した時等の、トロンビンの酵素活性への影響を考慮して選択され用いられる。これらは、単独で使用しても安定化効果があり、さらに2種以上を選択して使用することにより一層の安定化効果が期待できる。好ましくは2種以上を組み合わせで使用する。特に好ましくはカルシウムイオンと水溶性有機酸とを組み合わせで使用することであり、トロンビンの安定化効果はほぼ100%得られる。トロンビンの安定化機能を有する上記化合物を2種以上組み合わせで含有させる場合、上記各化合物の使用量の範囲内で各化合物を使用すればよい。また、これらの化合物を単独で使用する場合にお
- 20 いても、2種以上組み合わせで使用する場合においても、トロンビンの液状製剤にあつては液状製剤中に上記の濃度で含有させ、乾燥製剤または凍結乾燥製剤にあつては最終的に液状になしたときの終濃度が上記の濃度になるように調整し含
- 25



有させる。

(測定再現性の向上のための添加物)

本発明は、上記本発明のトロンビンの安定化手段に加えて、トロンビン活性の測定再現性を向上させるために、高分子多糖類、および合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせるその有効量を含有させてもよい。この場合における測定再現性の有効量とは、再現性を向上させる量であればよく、特に限定されないが、例えばトロンビンを含む試薬を用いて被検物質を20回測定した場合において、変動係数であるCV値が、少なくとも10%以下、好ましくは7%以下、より好ましくは5%以下に保つことができる量をいう。

10 高分子多糖類としては、デキストラン40、デキストラン70、デキストラン200、000、デキストラン500、000、フィコール等、合成高分子類としては、ポリビニルアルコール500、ポリビニルアルコール1500、ポリビニルアルコール2000、ポリエチレングリコール1500、ポリエチレングリコール2000、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール8000、ポリエチレングリコール20000およびポリビニルピロリドン等を挙げることができる。しかし、これらと同等物であって、トロンビンを含む試薬を用いる被検物質の測定再現性向上が達成される限りはこれらに限定されるものではない。また、これらの高分子物質は1種もしくは2種以上を組み合わせる選択し使用できる。

20 高分子多糖類もしくは合成高分子類の再現性有効量は、再現性を向上させる量であればよく、特に限定されないが、例えばトロンビンの、液状時における終濃度が、1～10重量/容量%であることが好適で、より好ましくは1～3重量/容量%である。トロンビンの液状製剤にあつては液状製剤中に上記の濃度で含有させ、乾燥製剤または凍結乾燥製剤にあつては最終的に液状になしたときの終濃度が上記の濃度になるように調整し含有させる。

(トロンビン含有組成物)

本発明のトロンビン含有組成物は、トロンビンに、少なくともカルシウムイオ

- ン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物をトロンビンについての安定化有効量を含有してなるか、これらに加えてトロンビン安定化機能を有する水溶性有機酸をその有効量含有してなる。また、これらのトロンビン安定化機能を有する化合物の他に、トロンビン
- 5    含有した試薬を用いる被検物質の測定再現性を向上させるために、高分子多糖類、および合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせ
- 10    てその有効量を含有せしめてなる。トロンビン含有組成物は溶液状態において、通常緩衝液が使用される。その種類は、pH 4～9の範囲に緩衝能をもつ緩衝剤を適宜選択して用いる。例えば、HEPES、MOPS、BIS-TRIS、T
- 15    RIS、MOPSO、ADA、MES等から1種もしくは2種以上が選択され用いられる。またトロンビン含有組成物には適当な防腐剤を添加してもよい。防腐剤としては、シプロフロキサシン、プロピオン酸もしくは安息香酸ナトリウム等の中から1種もしくは2種以上が選択して用いられる。また、必要に応じて食塩等の塩や、アミノ酸、糖等の一般的な安定化剤等を含ませることもある。
- 20    かくして得られるトロンビン含有組成物は、従来使用されているトロンビン試薬や組成物と比較して安定性が高く、トロンビン含有した試薬を用いる被検物質の測定再現性もよい。
- 25    具体的には、5 mM～25 mMの緩衝液に、5 mM～100 mMのカルシウムイオン、例えば乳酸カルシウムを加え、10 mM～500 mMの有機酸、例えば酢酸を加え、さらに合成高分子類、例えばポリビニルアルコール500を1～10重量/容量%、および/または界面活性剤、例えばTween 80を0.001～1%添加する。これらの化合物の添加濃度は、適宜調整可能である。防腐剤を添加した後、溶液のpHを6～7付近に調整して母液を調製する。この母液に目的とする濃度または活性量のトロンビンを溶解し、トロンビン溶液を調製する。
- 30    その溶液を適当な孔径のフィルターで濾過することもある。このようにして調製されたトロンビン溶液は、そのまま液状試薬としてあるいは凍結乾燥処理して乾燥製剤試薬として製剤化され使用に提供される。上記具体例は、本発明のトロン

ビン含有組成物の一例を示すものであり、本発明はこの例に限定されるものではない。

#### 実施例

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施

5 例に限定されるものではない。

#### (実施例 1)

20 mMのHEPES緩衝液 (pH 6.0) (無添加溶液)、同緩衝液に 25 mMの乳酸カルシウムを加えた溶液 (Ca 添加溶液)、同緩衝液に 100 mMの酢酸を加え pH 6.0 に調整した溶液 (酢酸添加溶液)、および酢酸添加溶液に 25 mM  
10 Mの乳酸カルシウムを加えた溶液 (二種添加溶液) の4種類の溶液を調製し、それぞれにヒトロンビンを 100 単位/ml となるように添加しロンビン溶液を調製した。調製したロンビン溶液に防腐剤としてシプロフロキサシン 0.1 重量/容量%を加えて 0.22  $\mu$ mのフィルターで除菌ろ過後、ガラス瓶に 3 ml  
15 ずつ分注し、密栓後 25°Cで保存した。調製直後、1、2、3、4、5および6ヶ月後のロンビンの残存活性を日本薬局方に従って測定し、ロンビンの安定化効果を調べた。その結果を表 1 に示した。

(表 1) (ロンビンの残存活性: 25°C保存)

	保 存 期 間						
	調製直後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	5ヶ月	6ヶ月
無添加	100	89	84	57	35	17	8
Ca 添加	100	93	90	88	83	81	72
酢酸添加	100	97	93	89	85	82	74
二種添加	100	100	101	98	100	97	102

(単位: %)

20 この結果、少なくともカルシウムを添加することによりロンビンが安定化さ

- れ、25℃で6ヶ月保存した後も72%の残存活性が保持された。酢酸添加の効果は、特開昭56-39782に開示されている効果ではあるが、有機酸である酢酸の添加に加えてさらにカルシウムを添加することにより安定化効果がより高くなり、25℃で6ヶ月保存した後も全くトロンビン活性の低下は認められず、
- 5 完全に安定化されることがわかった。

(実施例2)

- 10 10 mMのHEPES緩衝液 (pH 7.0) に150 mMの食塩、0.1重量/容量%のアジ化ナトリウムを添加した後、20 mMとなるように乳酸カルシウムを添加した溶液および乳酸カルシウム無添加の溶液を調製した。これらの溶液に、更にポリビニルアルコール205 (PVA 205)、ポリビニルアルコール500 (PVA 500)、またはポリビニルアルコール1500 (PVA 1500) をそれぞれ無添加、0.1、0.5、1、2、3および5重量/容量%となるように添加した溶液を調製した。
- 15 各溶液にトロンビンを100単位/mlとなるように溶解し、トロンビン溶液を調製した。調製した各トロンビン溶液を用いて、市販のコントロール血漿についてフィブリノゲン濃度の測定を行った。コントロール血漿をフィブリノゲン測定用緩衝液で10倍希釈したものを試料として、その100  $\mu$ lに上記調製したトロンビン溶液50  $\mu$ lを加え、37℃でその凝固するまでの時間を測定した。
- 20 上記一連の操作は、全自動凝固分析装置コアグレックス700 (島津製作所製) を用いて行った。同一試料を同時に20回測定して得られた凝固時間をもとにその変動係数を求め再現性の比較を行った。その結果を表2に示した。

(表2) (ポリビニルアルコール添加トロンビン試薬の再現性)

20 mM 乳酸カル シウム	PVA 種類	ポリビニルアルコール (PVA) 濃度						
		無添加	0.1%	0.5%	1%	2%	3%	5%
無添加	PVA205	20.1	17.8	18.6	15.5	14.3	14.3	16.5
	PVA500	22.3	15.0	17.8	15.3	14.1	14.8	16.7
	PVA1500	20.6	19.3	17.5	14.7	15.2	14.2	17.8
添加	PVA205	13.6	9.0	8.6	5.8	4.3	4.9	6.5
	PVA500	16.3	5.0	7.8	5.0	4.1	4.8	6.7
	PVA1500	15.6	9.0	7.5	3.7	6.5	7.1	7.8

(単位: CV%)

- 表 2 から、変動係数が乳酸カルシウムを 20 mM 添加したトロンビン溶液の方が
- 5 が乳酸カルシウム無添加のトロンビン溶液よりも小さくなり、再現性が向上することがわかった。さらにポリビニルアルコールを添加することにより再現性の向上がはかられることが判明し、1～3 重量/容量%でその効果は最大であった。実施例 1 の結果と実施例 2 の結果より、カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、再現性の向上に有効であることが判った。

10

(実施例 3)

- ポリビニルアルコールに代えてデキストラン 40 (Dex 40)、デキストラン 70 (Dex 70)、デキストラン 200, 000 (Dex 200) を用い、その濃度を 0.1、0.5、1、3、5、6、8 および 10 重量/容量%とし、全
- 15 に 20 mM 乳酸カルシウムを含ませた以外はすべて実施例 2 と同様に操作して、再現性の比較を行った。その結果を表 3 に示した。

(表3) (カルシウム無添加のデキストラン添加トロンビン試薬の再現性)

Dex種類	デキストラン (Dex) 濃度								
	無添加	0.1%	0.5%	1%	3%	5%	6%	8%	10%
Dex40	13.6	21.0	12.8	9.9	4.8	3.4	3.4	3.7	4.3
Dex70	16.3	7.3	9.7	6.1	3.3	6.7	6.5	6.7	6.7
Dex200	15.6	20.1	14.2	8.8	4.6	5.8	5.5	6.3	7.0

(単位: CV%)

- 表3から、高分子多糖類であるデキストラン類を添加することにより再現性の向上がはかられることが判明し、1～10重量/容量%の濃度でその効果は最大であった。

## (実施例4)

- 試料として20mMのHEPES緩衝液(pH6.0)(無添加溶液)、同緩衝液に25mMの乳酸カルシウムを加えpH6.0に調整した溶液(Ca添加溶液)、同緩衝液に100mMの酢酸を加えpH6.0に調整した溶液(酢酸添加溶液)、同緩衝液に0.02重量/容量%のTween80を加えpH6.0に調整した溶液(Tween80溶液)、同緩衝液に1.0重量/容量%のウシ血清アルブミンを加えpH6.0に調整した溶液(1%BSA)、同緩衝液に2.0重量/容量%のウシ血清アルブミンを加えpH6.0に調整した溶液(2%BSA)、同緩衝液に0.1重量/容量%の水溶性ゼラチンを加えpH6.0に調整した溶液(水溶性ゼラチン)、および、上記酢酸添加溶液に25mMの乳酸カルシウムを加えpH6.0に調整した溶液(二種添加溶液)、上記酢酸添加溶液に25mMの乳酸カルシウムおよび0.02重量/容量%のTween80を加えpH6.0に調整した溶液(三種添加溶液)の9種類の溶液を調製し、それぞれにヒトトロンビンを100単位/mlとなるように添加し、トロンビン溶液を調製した。

調製したトロンビン溶液に防腐剤としてシプロフロキサシン0.1重量/容

量%を加え、0.22  $\mu$ mのフィルターで除菌ろ過後、ガラス瓶に3 mLずつ分注し、密栓後25℃で保存した。調製後、1、2、3、4、5および6ヶ月後のトロンビンの残存活性を日本薬局方に従って測定し、トロンビンの安定化効果を調べた。その結果を表4に示した。

5

(表4) (トロンビンの残存活性：25℃保存)

	保 存 期 間						
	調製直後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	5ヶ月	6ヶ月
無添加	100	89	79	57	35	17	8
Ca 添加	100	93	90	88	83	81	72
酢酸添加	100	97	93	89	85	82	74
Tween80 添加	100	94	92	87	84	81	78
1%BSA 添加	100	95	91	89	83	80	75
2%BSA 添加	100	90	86	83	78	74	72
0.1% 水溶性ゼラチン添加	100	91	85	83	78	75	73
二種添加	100	100	101	98	100	97	102
三種添加	100	102	98	101	100	101	100

(単位%)

この結果、無添加溶液に比べ、Ca、酢酸、Tween80、1%BSA、2%BSA、水溶性ゼラチンの添加によりトロンビンの安定性が向上し、さらに上記Caおよび酢酸の二種添加溶液、Ca、酢酸およびTween80の三種添加溶液により、さらに安定化性が向上した。

10

## 産業上の利用可能性

- 以上説明したように、少なくともカルシウムの添加によりトロンビンが安定化され、さらに有機酸の補助添加により一層の安定化効果が得られた。その他、トロンビンの安定化に、界面活性剤やタンパク質も有用であることを見出した。また、カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、トロンビン活性の測定再現性の向上に有効であることも判明した。さらに高分子多糖類または合成高分子類が、トロンビン活性の測定再現性の向上に有用であることを見出した。かくして本発明のトロンビンの安定化手段および該安定化手段を導入したトロンビン含有組成物は、従来にないトロンビンの安定化手段を提供するものであり、極めて有用な臨床検査用試薬組成物を提供するものである。



## 請求の範囲

1. カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段。
2. カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のトロンビンの安定化手段。
3. 少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする請求の範囲第2項に記載のトロンビンの安定化手段。
4. 少なくとも請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物。
5. トロンビン含有した試薬を用いる被検物質の測定再現性確保のために、高分子多糖類および/または合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせてなる測定再現性機能を有する物質を、有効量含有することを特徴とする請求の範囲第4項に記載のトロンビン含有組成物。
6. 液状製剤であることを特徴とする請求の範囲第4項または第5項に記載のトロンビン含有組成物。
7. 少なくとも請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物の製造方法。
8. 少なくとも請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物を試薬として用

いる測定方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06513

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EP, 40799, A (Boehringer Mannheim GmbH), 02 December, 1981 (02.12.81) & JP, 57-018985, A & US, 4409334, A	1-2,4,6-7/ 3,5,8
X/Y	JP, 56-39782, A (Daichi Pure Chem. Co., Ltd.), 15 April, 1981 (15.04.81) (Family: none)	1-4,6-8/5
Y/A	EP, 221700, A2 (Warner-Lambert Company), 13 May, 1987 (13.05.87) & JP, 62-106028, A & US, 4696812, A1	3,5,8/ 1-2,4,6-7
A	EP, 302754, A (Green Cross Corporation), 08 February, 1989 (08.02.89) & JP, 1-040433, A	1-8
A	EP, 443724, A (Baxter International Inc.), 28 August, 1991 (28.08.91) & JP, 52-27962, A & US, 5354682, A & DE, 69130990, E	1-8
A	EP, 823475, A2 (Chemo. Sero. Therapeut. Res. Inst.), 11 February, 1998 (11.02.98)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 December, 2000 (12.12.00)

Date of mailing of the international search report  
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06513

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& JP, 10-052267, A & US, 5811279, A	
A	WO, 96/26269, A1 (Common Service Agency), 29 August, 1996 (29.08.96) & EP, 813598, A1 & JP, 11-500619, A1 & US, 5907032, A	1-8
A	EP, 570354, A1 (Immuno Aktiengesellschaft), 18 November, 1993 (18.11.93) & JP, 6-046898, A	1-8
A	EP, 699909, A2 (Nippon Shoji K.K.), 06 March, 1996 (06.03.96) & JP, 08-070895, A & US, 005851836, A	1-8

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	EP, 40799, A (ヘーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 2. 12月. 1981 (02. 12. 81) &JP, 57-018985, A &US, 4409334, A	1-2, 4, 6-7/ 3, 5, 8
X/Y	JP, 56-39782, A (第一化学薬品株式会社) 15. 4月. 1981 (15. 04. 81) ファミリーなし	1-4, 6-8/5
Y/A	EP, 221700, A2 (ワナー・レンバート・カンパニー) 13. 5月. 1987 (13. 05. 87) &JP, 62-106028, A &US, 4696812, A1	3, 5, 8/ 1-2, 4, 6-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 302754, A (株式会社 ミドリ十字) 8. 2月. 1989 (08. 02. 89) &JP, 1-040433, A	1-8
A	EP, 443724, A (パクター・インターナショナル・インコーポレイテッド) 28. 8月. 1991 (28. 08. 91) &JP, 52-27962, A &US, 5354682, A &DE, 69130990, E	1-8
A	EP, 823475, A2 (財団法人化学及血清療法研究所) 11. 2月. 1998 (11. 02. 98) &JP, 10-052267, A &US, 5811279, A	1-8
A	WO, 96/26269, A1 (コモン サーヴ イス エージェンシー) 29. 8月. 1996 (29. 08. 96) &EP, 813598, A1 &JP, 11-500619, A1 &US, 5907032, A	1-8
A	EP, 570354, A1 (イムノ・アクチング・ゼルシャフト) 18. 11月. 1993 (18. 11. 93) &JP, 6-046898, A	1-8
A	EP, 699909, A2 (日本商事株式会社) 6. 3月. 1996 (06. 03. 96) &JP, 08-070895, A &US, 005851836, A	1-8

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 GP00-1020	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/06513	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 27.09.99	
出願人(氏名又は名称) 国際試薬株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	EP, 40799, A (ヘーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 2. 12月. 1981 (02. 12. 81) &JP, 57-018985, A &US, 4409334, A	1-2, 4, 6-7/ 3, 5, 8
X/Y	JP, 56-39782, A (第一化学薬品株式会社) 15. 4月. 1981 (15. 04. 81) ファミリーなし	1-4, 6-8/5
Y/A	EP, 221700, A2 (リーナ-ランバートカンパニー) 13. 5月. 1987 (13. 05. 87) &JP, 62-106028, A &US, 4696812, A1	3, 5, 8/ 1-2, 4, 6-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日 26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A ✓	EP, 302754, A (株式会社 ミドリ十字) 8. 2月. 1989 (08. 02. 89) &JP, 1-040433, A	1-8
A ✓	EP, 443724, A (バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド) 28. 8月. 1991 (28. 08. 91) &JP, 52-27962, A &US, 5354682, A &DE, 69130990, E	1-8
A ✓	EP, 823475, A2 (財団法人化学及血清療法研究所) 11. 2月. 1998 (11. 02. 98) &JP, 10-052267, A &US, 5811279, A	1-8
A ✓	WO, 96/26269, A1 (コモン サーヴァ イシス エージェンシー) 29. 8月. 1996 (29. 08. 96) &EP, 813598, A1 &JP, 11-500619, A1 &US, 5907032, A	1-8
A ✓	EP, 570354, A1 (イムノ・アクチエンゲゼルシャフト) 18. 11月. 1993 (18. 11. 93) &JP, 6-046898, A	1-8
A ✓	EP, 699909, A2 (日本商事株式会社) 6. 3月. 1996 (06. 03. 96) &JP, 08-070895, A &US, 005851836, A	1-8



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 16 NOV 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 書類記号 GP00-1020	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06513	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 27.09.99
国際特許分類(IPC) Int, Cl <sup>7</sup> C12N9/96, C12Q1/37, C12N9/74		
出願人(氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 2 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.03.01	国際予備審査報告を作成した日 25.10.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 本間 夏子	4N 9637
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-14 ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 4-6 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 1, 3, 7-8 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 2 項、 03.10.01 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: EP 40799 A(ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング)  
2.12月.1981

文献2: JP 56-39782 A(第一化学薬品株式会社)15.4月.1981

文献3: EP 221700 A2(ワナーランバートカンパニー)13.5月.1987

請求の範囲1~8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~3に対して進歩性を有する。文献1~3にはトロンピンを安定化させるのに、カルシウムイオン、界面活性剤、およびゼラチンから選択される1または2以上の化合物を用いることは記載されておらず、しかもその点は1~3から当業者といえども容易に想到し得ないものである。



請求の範囲

1. カルシウムイオン、界面活性剤、およびゼラチンから選択される 1 または 2 以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段。
2. (補正後) カルシウムイオン、界面活性剤、およびゼラチンから選択される 1 または 2 以上のトロンビン安定化機能を有する化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載のトロンビンの安定化手段。
3. 少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段。
4. 少なくとも請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれか 1 項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物。
5. トロンビンを含む試薬を用いる被検物質の測定再現性確保のために、高分子多糖類および/または合成高分子類から選択された 1 種または 2 種以上を組み合わせる測定再現性機能を有する物質を、有効量含有することを特徴とする請求の範囲第 4 項に記載のトロンビン含有組成物。
6. 液状製剤であることを特徴とする請求の範囲第 4 項または第 5 項に記載のトロンビン含有組成物。
7. 少なくとも請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれ



15/1

か 1 項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物の製造方法。

8. (補正後) 少なくとも請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物を試薬として用



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 June 2001 (18.06.01)	
International application No. PCT/JP00/06513	Applicant's or agent's file reference GP00-1020
International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)	Priority date (day/month/year) 27 September 1999 (27.09.99)
Applicant OKUDA, Masahiro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 02 March 2001 (02.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--





## PATENT COOPERATION TREATY

2002.6.12



## PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Takashi  
SN Iwamotocho Building  
6th Floor  
2-10, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 May 2002 (30.05.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference GP00-1020 /PCT	
International application No. PCT/JP00/06513	International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)
Applicant INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION et al	

## 1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

## 2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,CA,CN,KP,RO,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,  
GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,  
MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

## 3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Elliott PERETTI
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

37  
Translation

Applicant's or agent's file reference GP00-1020	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06513	International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)	Priority date (day/month/year) 27 September 1999 (27.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/96, C12Q 1/37, C12N 9/74		
Applicant INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  
These annexes consist of a total of 2 sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 March 2001 (02.03.01)	Date of completion of this report 25 October 2001 (25.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

1944

1944

1944

1944

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 00/06513

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: EP, 40799, A (Boehringer Mannheim GmbH); 2  
December 1981

Document 2: JP, 56-39782, A (Daiichi Pure Chem. Co.,  
Ltd.), 15 April 1981

Document 3: EP, 221700, A2 (Warner-Lambert Company), 13  
May 1987

The inventions set forth in Claims 1-8 involve an inventive step relative to Documents 1-3, cited in the international search report. Documents 1-3 do not disclose the use of one or two or more selected from calcium ions, surfactants and gelatine for stabilizing thrombin, and a person skilled in the art could not easily deduce this feature from Documents 1-3.

RECEIVED

JUL 31 2002

OIPE/JCWS